

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-243949

(43)Date of publication of application : 14.09.1999

(51)Int.Cl.

C12N 9/04
C12N 1/21
C12N 9/96
C12N 15/09
//(C12N 9/04
C12R 1:19)
(C12N 1/21
C12R 1:19)
(C12N 15/09
C12R 1:01)

(21)Application number : 10-050817

(71)Applicant : TOYOB0 CO LTD

(22)Date of filing : 03.03.1998

(72)Inventor : TAKESHIMA SEIJI
HATTORI SHIZUO
KAWAMURA YOSHIHISA
ADACHI KAZUO
MATSUSHITA KAZUNOBU

(54) GLUCOSE DEHYDROGENASE HAVING PQQ AS PROSTHETIC GROUP AND ITS
PRODUCTION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a new glucose dehydrogenase producible in a mass at a low cost by gene recombination technique and useful for the determination of blood sugar level, etc.

SOLUTION: This enzyme is (A) a protein composed of the amino acid sequence described by formula or (B) a protein composed of the amino acid sequence of formula provided that one or several amino acid sequences are deleted, substituted or added and having glucose dehydrogenase activity. The glucose dehydrogenase having PQQ as prosthetic group is produced by culturing a PQQ-producing transformed microorganism obtained by transforming a microorganism such as *Pseudomonas aeruginosa* with a recombinant vector integrated with a DNA fragment containing a gene coding for the enzyme.

Met Asn 139 His Leu Leu Asn 141 Lys 142 Thr Ile 143 Leu 144 Gln 145 Asn 146
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
Leu Phe 147 Tyr 148 His 149 Thr 150 Asn 151 Phe 152 Asp 153 Ile 154 Thr 155 Phe 156
20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

Thr Asp 312 Asn 313 Gly 314 Asn 315 Val 316 Gln 317 Asn 318 Asp 319 Lys 320 Asn 321
350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400
Ter 396 Asp 397 Gly 398 Asn 399 Gly 400 Ser 401 Lys 402 Ile 403 Lys 404 Phe 405 Thr 406 Asn 407 Gly 408
460 470 475 480

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) **公開特許公報 (A)**

(11)特許出願公開番号

特開平11-243949

(43)公開日 平成11年(1999)9月14日

(51) Int.Cl.⁶
C 1 2 N 9/04
1/21
9/96
15/09
// (C 1 2 N 9/04

識別記号
Z N A

F I
C 1 2 N 9/04
1/21
9/96
15/00
Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数34 O L (全 18 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平10-50817

(22)出願日 平成10年(1998)3月3日

(71)出願人 000003160
東洋紡績株式会社
大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(72)発明者 竹嶋 誠嗣
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株
式会社敦賀バイオ研究所内
(72)発明者 服部 静夫
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株
式会社敦賀バイオ研究所内
(72)発明者 川村 良久
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株
式会社敦賀バイオ研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 P QQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼおよびその製造方法

(57)【要約】

【課題】 遺伝子組換え技術により、低コストでしかも多量の P QQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼを提供する。

【解決手段】 P QQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を組み込んでなる組換えベクターにより P QQ生産能を有する微生物を形質転換することによって得られた形質転換体を培養し、該培養物から採取される P QQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼおよびその製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)または(b)のタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼ。

(a) 配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

【請求項2】 配列表・配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼ。

【請求項3】 以下の(e)または(f)のタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼ。

(e) 配列表・配列番号3に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(f) アミノ酸配列(e)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

【請求項4】 配列表・配列番号3に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼ。

【請求項5】 以下の(a)または(b)のタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子。

(a) 配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

【請求項6】 配列表・配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子。

【請求項7】 以下の(c)または(d)のタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子。

(c) 配列表・配列番号2に記載された塩基配列からなるDNA

(d) 上記(c)の配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されており、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

【請求項8】 配列表・配列番号2に記載される塩基配列からなるDNAを有するPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子。

【請求項9】 以下の(e)または(f)のタンパク質

であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子。

(e) 配列表・配列番号3に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(f) アミノ酸配列(e)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

【請求項10】 配列表・配列番号3に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子。

【請求項11】 以下の(g)または(h)のタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子。

(g) 配列表・配列番号4に記載された塩基配列からなるDNA

(h) 上記(g)の配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されており、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードしているDNA

【請求項12】 配列表・配列番号4に記載される塩基配列からなるDNAを有するPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子。

【請求項13】 請求項5～12のいずれかに記載のPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含有する組換えベクター。

【請求項14】 PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片が組み込まれ、かつPQQ生産能を有する微生物において複製できることを特徴とする請求項13記載の組換えベクター。

【請求項15】 請求項13または14に記載の組換えベクターでPQQ生産能を有する微生物を形質転換した形質転換体。

【請求項16】 PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼがアシネトバクター・カルコアセティカス(Acinetobacter calcoaceticus)もしくはアシネトバクター・バウマンニ(Acinetobacter baumannii)由来である請求項15記載の形質転換体。

【請求項17】 PQQ生産能を有する微生物がシードモナス(Pseudomonas)属またはアシネトバクター(Acinetobacter)属に属する微生物である請求項15記載の形質転換体。

【請求項18】 PQQ生産能を有する微生物がシードモナス・エルギノサ(Pseudomonas aeruginosa)、シードモナス・フルオレッセンス(Pseudomonas fluorescens)、シードモナス・プチダ(Pseudomonas putida)、アシネトバクター・カルコアセティカス(Acinetobacter calcoaceticus)、アシネトバクター・バウマ

ンニ (*Acinetobacter baumannii*) からなる群より選ばれた微生物である請求項 1 5 記載の形質転換体。

【請求項 19】 PQQ 生産能を有する微生物がシードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) である請求項 1 7 記載の形質転換体。

【請求項 20】 PQQ 生産能を有する微生物がアシネトバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcaceticus*) もしくはアシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) である請求項 1 7 記載の形質転換体。

【請求項 21】 PQQ を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼが可溶性である請求項 1 9 または 2 0 に記載の形質転換体。

【請求項 22】 PQQ を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含む DNA 断片を組込んでなる組換えベクターで PQQ 生産能を有する微生物が形質転換された形質転換微生物を培養して、該培養物から PQQ を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼを採取するグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法。

【請求項 23】 PQQ を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼがアシネトバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) もしくはアシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) 由来の微生物である請求項 2 2 記載のグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法。

【請求項 24】 PQQ 生産能を有する微生物がシードモナス (*Pseudomonas*) 属またはアシネトバクター (*Acinetobacter*) 属に属する微生物である請求項 2 3 記載のグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法。

【請求項 25】 PQQ 生産能を有する微生物がシードモナス・エルギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*) 、シードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*) 、シードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) 、アシネトバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) 、アシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) からなる群より選ばれた微生物である請求項 2 3 記載のグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法。

【請求項 26】 PQQ 生産能を有する微生物がシードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) である請求項 2 3 記載のグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法。

【請求項 27】 PQQ 生産能を有する微生物がアシネトバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcaceticus*) もしくはアシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) である請求項 2 3 記載のグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法。

【請求項 28】 PQQ を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼが可溶性である請求項 2 6 または 2 7 に記載のグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法。

【請求項 29】 PQQ を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼを GOOD の緩衝液の存在下に凍結乾燥して保持することを特徴とするグルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法。

【請求項 30】 カルシウムが共存する請求項 2 9 記載のグルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法。

【請求項 31】 GOOD の緩衝液が PIPES 、 M E S 、 MOPS からなる群より選ばれた緩衝液である請求項 3 0 または 3 1 に記載のグルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法。

【請求項 32】 PQQ を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼを GOOD の緩衝液の存在下に凍結乾燥して保持されたものであることを特徴とする安定化されたグルコースデヒドロゲナーゼ組成物。

【請求項 33】 カルシウムが共存する請求項 3 2 記載のグルコースデヒドロゲナーゼ組成物。

【請求項 34】 GOOD の緩衝液が PIPES 、 M E S 、 MOPS からなる群より選ばれた緩衝液である請求項 3 2 または 3 3 に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、 PQQ を補欠分子族とする新規なグルコースデヒドロゲナーゼ (以下、 G DH とも言う) 、該 G DH をコードする遺伝子、該 G DH をコードする遺伝子断片を組み込んでなる組換えベクター、該組換えベクターで PQQ 生産能を有する微生物が形質転換された形質転換体、該形質転換体を培養することによる G DH の製造方法、 G DH の安定化方法ならびに該安定化方法により安定化された G DH 組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】 G DH は、 1959 年にノルウェーの J. G. Hauge によって未知のキノン化合物を有する酵素として発見された。一方、 PQQ (Pyrrolo Quinoline Quinone) は脱水素酵素の第三の補酵素として、 1979 年にその化学構造が決定されており、メタノール資化菌のメタノール脱水素酵素や酢酸菌のアルコール脱水素酵素やグルコース脱水素酵素を中心に、多くの生物において、主として脱水素酵素でその存在が確認されている。

【0003】 これらの脱水素酵素は人工電子受容体を還元できるので、ニトロブルーテトラゾリウムのような色素を用いると可視光で、しかも感度よく検出できること、および NAD 依存性脱水素酵素のように平衡反応ではなく一方向への反応であるので、微量の化合物の定量に極めて有用であるとされている (飴山実、 *Methods in Enzymol.* 第 89 卷、 20 (1982)) 。

【0004】 PQQ を補欠分子族とする酵素の中で最も有用性が高いのは、 PQQ 依存性 G DH であり、血糖の測定に用いることができる。実際の使用に関しては、通

常の生化学試薬としての使用はもちろん、膜に固定したドライ試薬の呈色反応やチップに固定したセンサー用途等幅広く応用することが可能である。グルコースに同様に作用するグルコースオキシダーゼやNAD(P)依存性G DHと比較し、溶存酸素の影響を受けないことや、反応がシンプルなためデバイスを簡単に、しかも安価にできることができることが特徴である。

【0005】上記PQQを補欠分子族とするG DHのクローニングはアシネットバクター・カルコアセティカス(*Acinetobacter calcoaceticus*) LMD79.41 (A.-M. Cleton-Jansenら, *J. Bacteriol.*, 170, 2121 (1988) および *Mol. Gen. Genet.*, 217, 430 (1999))、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*) (A.-M. Cleton-Jansenら, *J. Bacteriol.*, 172, 6308 (1990))、グルコノバクター・オキシダンス(*Gluconobacter oxydans*) (*Mol. Gen. Genet.*, 229, 206 (1991))等で報告されており、大腸菌での発現も確認されている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】遺伝的によく解析されており、かつ形質転換する宿主として最適化されている大腸菌をはじめとする腸内細菌はPQQを産生しないことが知られており、もしPQQを補欠分子族とするG DHをコードする遺伝子断片を組み込んでなるベクターで大腸菌を形質転換し、該大腸菌を培養しても活性のないアポ型G DHしか得られないことが知られている。これらのアポ型G DHは外からPQQを加えることにより活性のあるホロ型G DHに変換可能であるが、必要とするPQQは試薬として非常に高価である。また、工業的スケールでは全てのアポ型がホロ型に変換されないことが確認されている。

【0007】また、*Biotechnol. Lett.*, 16, 12, 1265 (1994) には形質転換大腸菌を培養する際、培地にPQQを加えて活性のあるホロ型G DHを生産することが報告されているが、この場合も高価なPQQを多量に用いる必要がある。さらに、*Mol. Gen. Genet.*, 229, 206 (1991) には、グルコノバクター・オキシダンスのG DHをコードする遺伝子断片をグルコノバクター・オキシダンス自身の染色体に組み込んで発現させているが、この場合は染色体上に存在し、多コピーではないため発現量は小さい。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記目的を達成するために種々検討した結果、PQQを補欠分子族とするG DHをコードする遺伝子を含むDNA断片を組み込んでなる組換えベクターによりPQQ生産能を有する微生物を形質転換することによって得られた形質転換微生物を培養し、該培養物からPQQを補欠分子族とするG DHを採取することによって、安価にG DHを大量生産できることを見出し、本発明に到達した。

【0009】すなわち、本発明は、PQQを補欠分子族とするG DHをコードする遺伝子を含むDNA断片を組み込んでなる組換えベクターでPQQ生産能を有する微生物を形質転換することによって得られることを特徴とする形質転換微生物を、培養して培養物からPQQを補欠分子族とするG DHを採取すること特徴とするG DHの製造方法である。

【0010】本発明は、以下の(a)または(b)のタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼである。

(a) 配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

本発明は、配列表・配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼである。

【0011】本発明は、以下の(e)または(f)のタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼである。

(e) 配列表・配列番号3に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(f) アミノ酸配列(e)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

本発明は、配列表・配列番号3に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼである。

【0012】本発明は、以下の(a)または(b)のタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である。

(a) 配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

本発明は、配列表・配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である。

【0013】本発明は、以下の(c)または(d)のタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である。

(c) 配列表・配列番号2に記載された塩基配列からなるDNA

(d) 上記(c)の配列において、1もしくは数個の塩

基が欠失、置換もしくは付加されており、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

本発明は、配列表・配列番号2に記載される塩基配列からなるDNAを有するPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である。

【0014】本発明は、以下の (e) または (f) のタンパク質である PQQ を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である。

(e) 配列表・配列番号3に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(f) アミノ酸配列 (e)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

本発明は、配列表・配列番号3に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である。

【0015】本発明は、以下の (g) または (h) のタンパク質である PQQ を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である。

(g) 配列表・配列番号 4 に記載された塩基配列からなる DNA

(h) 上記 (g) の配列において、1 もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されており、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードしているDNA

本発明は、配列表・配列番号4に記載される塩基配列からなるDNAを有するPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である。

【0016】本発明は、上記PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含有する組換えベクターである。本発明は、PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片が組み込まれ、かつPQQ生産能を有する微生物において複製できることを特徴とする上記組換えベクターである。

【0017】本発明は、上記の組換えベクターでPQQ生産能を有する微生物を形質転換した形質転換体である。本発明は、PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼがアシнетバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) もしくはアシнетバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) 由来である上記形質転換体である。本発明は、PQQ生産能を有する微生物がシュードモナス (*Pseudomonas*) 属またはアシнетバクター (*Acinetobacter*) 属に属する微生物である上記形質転換体である。

【0018】本発明は、PQQ生産能を有する微生物が
シードモナス・エルギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*)

10

a) 、シュードモナス・フルオレッセンス (Pseudomonas fluorescens) 、シュードモナス・プチダ (Pseudomonas putida) 、アシネットバクター・カルコアセティカス (Acinetobacter calcoaceticus) 、アシネットバクター・バウマンニ (Acinetobacter baumannii) からなる群より選ばれた微生物である上記形質転換体である。本発明は、PQQ生産能を有する微生物がシュードモナス・プチダ (Pseudomonas putida) である上記形質転換体である。本発明は、PQQ生産能を有する微生物がアシネットバクター・カルコアセティカス (Acinetobacter calc oaceticus) もしくはアシネットバクター・バウマンニ (Acinetobacter baumannii) である上記の形質転換体である。本発明は、PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼが可溶性である上記形質転換体である。

【0019】本発明は、PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を組込んでなる組換えベクターでPQQ生産能を有する微生物が形質転換された形質転換微生物を培養して、該培養物からPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼを採取するグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法である。

【0020】本発明は、PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼがアシネトバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) もしくはアシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumanii*) 由来の微生物である上記のグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法である。本発明は、PQQ生産能を有する微生物がシュードモナス (*Pseudomonas*) 属またはアシネトバクター (*Acinetobacter*) 属に属する微生物である上記グルコースデヒドロゲナーゼの製造方法である。

【0021】本発明は、PQQ生産能を有する微生物がシュードモナス・エルギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、シュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、アシネットバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*)、アシネットバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) からなる群より選ばれた微生物である上記グルコースデヒドロゲナーゼの製造方法である。本発明は、PQQ生産能を有する微生物がシュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) である上記グルコースデヒドロゲナーゼの製造方法である。本発明は、PQQ生産能を有する微生物がアシネットバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) もしくはアシネットバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) である上記グルコースデヒドロゲナーゼの製造方法である。本発明は、PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼが可溶性である上記グルコースデヒドロゲナーゼの製造方法であ

る。

【0022】本発明は、PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをGOODの緩衝液の存在下に凍結乾燥して保持することを特徴とするグルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法である。本発明は、カルシウムが共存する上記グルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法である。本発明は、GOODの緩衝液がPIPE S、MES、MOPSからなる群より選ばれた緩衝液である上記グルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法である。

【0023】本発明は、PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをGOODの緩衝液の存在下に凍結乾燥して保持されたものであることを特徴とする安定化されたグルコースデヒドロゲナーゼ組成物である。本発明は、カルシウムが共存する上記のグルコースデヒドロゲナーゼ組成物である。本発明は、GOODの緩衝液がPIPE S、MES、MOPSからなる群より選ばれた緩衝液である上記のグルコースデヒドロゲナーゼ組成物である。

【0024】

【発明の実施の形態】本発明のPQQを補欠分子族とするGDHをコードする遺伝子を含むDNA断片は、GDH生産菌より得ることができる。該GDH生産菌として、具体的には、例えばアシネットバクター・カルコアセティカス、アシネットバクター・バウマンニ (Acinetobacter baumannii) 、シュードモナス・エルギノサ (Pseudomonas aeruginosa) 、シュードモナス・プチダ (Pseudomonas putida) 、シュードモナス・フルオレッセンス (Pseudomonas fluorescens) 、グルコノバクター・オキシダンス等の酸化細菌やアグロバクテリウム・ラジオバクター (Agrobacterium radiobacter) 、エシェリヒア・コリ、クレブシーラ・エーロジーンズ (Klebsiella aerogenes) 等の腸内細菌を挙げることができる。なかでも、アシネットバクター・カルコアセティカスもしくはアシネットバクター・バウマンニの可溶性GDHが好ましい。

【0025】該GDHをコードする遺伝子はこれらの菌株より抽出してもよく、また化学的に合成することができる。さらに、PCR法の利用により、PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子を含むDNA断片を得ることも可能である。

【0026】上記GDHをコードする遺伝子としては、例えば(a)配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子、または(b)アミノ酸配列(a)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が挙げられる。

【0027】また、(e)配列表・配列番号3に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子、または(f)アミノ酸配列(e)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子も挙げができる。

10 【0028】さらに、(c)配列表・配列番号2に記載された塩基配列からなるDNA、または(d)上記(c)の配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されており、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードしているDNAがある。

【0029】さらに、(g)配列表・配列番号4に記載された塩基配列からなるDNA、または(h)上記(g)の配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されており、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードしているDNAがある。

【0030】本発明において、GDHをコードする遺伝子を得る方法としては、次のような方法が挙げられる。例えばアシネットバクター・カルコアセティカスNCIB11517の染色体を分離、精製した後、超音波処理、制限酵素処理等を用いてDNAを切断したものと、リニアーナー発現ベクターと両DNAの平滑末端または付着末端においてDNAリガーゼなどにより結合閉鎖させて組換えベクターを構築する。該組換えベクターを複製可能な宿主微生物に移入した後、ベクターのマーカーと酵素活性の発現を指標としてスクリーニングして、PQQを補欠分子族とするGDHをコードする遺伝子を含有する組換えベクターを保持する微生物を得る。

【0031】次いで、上記組換えベクターを保持する微生物を培養して、該培養微生物の菌体から該組換えベクターを分離、精製し、該発現ベクターからGDHをコードする遺伝子を採取することができる。例えば、遺伝子供与体であるアシネットバクター・カルコアセティカスNCIB11517の染色体DNAは、具体的には以下のようにして採取される。

【0032】該遺伝子供与微生物を例えば1～3日間攪拌培養して得られた培養液を遠心分離により集菌し、次いで、これを溶菌させることによりPQQを補欠分子族とするGDH遺伝子の含有溶菌物を調製することができる。溶菌の方法としては、例えばリゾチーム等の溶菌酵素により処理が施され、必要に応じてプロテアーゼや他の酵素やラウリル硫酸ナトリウム(SDS)等の界面活性剤が併用される。さらに、凍結融解やフレンチプレス処理のような物理的破碎方法と組み合わせてもよい。

【0033】上記のようにして得られた溶菌物からDNAを分離精製するには、常法に従って、例えばフェノー

ル処理やプロテアーゼ処理による除蛋白処理や、リボヌクレアーゼ処理、アルコール沈殿処理などの方法を適宜組み合わせることにより行うことができる。

【0034】微生物から分離、精製されたDNAを切断する方法は、例えば超音波処理、制限酵素処理などにより行うことができる。好ましくは特定のヌクレオチド配列に作用するII型制限酵素が適している。

【0035】クローニングする際のベクターとしては、宿主微生物内で自律的に増殖し得るファージまたはプラスミドから遺伝子組換え用として構築されたものが適している。ファージとしては、例えばエシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合にはLambda gt10、Lambda gt11などが例示される。また、プラスミドとしては、例えば、エシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合には、pBR322、pUC19、pBluescriptなどが例示される。

【0036】クローニングの際、上記のようなベクターを、上述したG DHをコードする遺伝子供与体である微生物DNAの切断に使用した制限酵素で切断してベクター断片を得ることができるが、必ずしも該微生物DNAの切断に使用した制限酵素と同一の制限酵素を用いる必要はない。微生物DNA断片とベクターDNA断片とを結合させる方法は、公知のDNAリガーゼを用いる方法であればよく、例えば微生物DNA断片の付着末端とベクター断片の付着末端とのアニーリングの後、適当なDNAリガーゼの使用により微生物DNA断片とベクターDNA断片との組換えベクターを作成する。必要に応じて、アニーリングの後、宿主微生物に移入して生体内のDNAリガーゼを利用し組換えベクターを作製することもできる。

【0037】クローニングに使用する宿主微生物としては、組換えベクターが安定であり、かつ自律増殖可能で外来性遺伝子の形質発現できるものであれば特に制限されない。一般的には、エシェリヒア・コリW3110、エシェリヒア・コリC600、エシェリヒア・コリHB101、エシェリヒア・コリJM109、エシェリヒア・コリDH5 α などを用いることができる。

【0038】宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物がエシェリヒア・コリの場合には、カルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポーレーション法などを用いることができる。

【0039】上記のように得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量のG DHを安定に生産し得る。宿主微生物への目的組換えベクターの移入の有無についての選択は、目的とするDNAを保持するベクターの薬剤耐性マーカーとPQQの添加によりG DH活性を同時に発現する微生物を検索すればよい。例えば、薬剤耐性マーカーに基づく選択培地で生育し、かつG DHを生成する微生物を選択すればよい。

【0040】上記の方法により得られたPQQを補欠分

子族とするG DH遺伝子の塩基配列は、Science, 第214巻, 1205(1981)に記載されたジデオキシ法により解読した。また、G DHのアミノ酸配列は上記のように決定された塩基配列より推定した。

【0041】上記のようにして、一度選択されたPQQを補欠分子族とするG DH遺伝子を保有する組換えベクターより、PQQ生産能を有する微生物にて複製できる組換えベクターへの移入は、G DH遺伝子を保持する組換えベクターから制限酵素やPCR法によりG DH遺伝子であるDNAを回収し、他のベクター断片と結合させることにより容易に実施できる。また、これらのベクターによるPQQ生産能を有する微生物の形質転換は、カルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポーレーション法などを用いることができる。

【0042】PQQ生産能を有する微生物としては、メチロバクテリウム(Methylobacterium)属等のメタノール資化性細菌、アセトバクター(Acetobacter)属やグルコノバクター(Gluconobacter)属の酢酸菌、フラボバクテリウム(Flavobacterium)属、シュードモナス属、アシネットバクター属等の細菌を挙げることができる。なかでも、シュードモナス属細菌とアシネットバクター属細菌が利用できる宿主ベクター系が確立されており利用しやすいので好ましい。

【0043】シュードモナス属細菌では、シュードモナス・エルギノサ、シュードモナス・フルオレッセンス、シュードモナス・プチダなどを用いることができる。また、アシネットバクター属細菌ではアシネットバクター・カルコアセティカス、アシネットバクター・バウマンニ等を用いることができる。

【0044】上記微生物にて複製できる組換えベクターとしては、RSF1010由来のベクターもしくはとその類似のレプリコンを有するベクターがシュードモナス属細菌に利用可能である。例えば、pKT240、pMMB24等(M. M. Bagdasarianら, Gene, 26, 273(1983))、pCN40、pCN60等(C. C. Nietoら, Gene, 87, 145(1990))やpTS1137等を挙げることができる。また、pME290等(Y. Itohら, Gene, 36, 27(1985))、pNI111、pNI20C(N. Itohら, J. Biochem., 110, 614(1991))も利用できる。

【0045】アシネットバクター属細菌では、pWM43等(W. Minasら, Appl. Environ. Microbiol., 59, 2807(1993))、pKT230、pWH1266等(M. Hungerら, Gene, 87, 45(1990))がベクターとして利用可能である。

【0046】形質転換体である宿主微生物の培養形態は、宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、多くの場合は液体培養で行う。工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。

【0047】培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては

資化可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、シーカロース、ラクトース、マルトース、ラクトース、糖蜜、ピルビン酸などが使用される。また、窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えば、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

【0048】培養温度は菌が成育し、G D Hを生産する範囲で適宜変更し得るが、上記のようなP Q Q生産能を有する微生物の場合、好ましくは20~42℃程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、G D Hが最高収量に達する時期を見計らって適当時期に培養を完了すればよく、通常は12~72時間程度である。培地のp Hは菌が発育し、G D Hを生産する範囲で適宜変更し得るが、好ましくはp H 6. 0~9. 0程度の範囲である。

【0049】培養物中のG D Hを生産する菌体を含む培養液をそのまま採取し、利用することもできるが、一般には、常法に従って、G D Hが培養液中に存在する場合はろ過、遠心分離などにより、G D H含有溶液と微生物菌体とを分離した後に利用される。G D Hが菌体内に存在する場合には、得られた培養物からろ過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いで、この菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的方法で破壊し、また、必要に応じて、E D T A等のキレート剤及び界面活性剤を添加してG D Hを可溶化し、水溶液として分離採取する。

【0050】上記のようにして得られたG D H含有溶液を、例えば減圧濃縮、膜濃縮、さらに硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、あるいは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈殿法により沈殿せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。その後、吸着剤あるいはゲルろ過剤などによるゲルろ過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーを行うことにより、精製されたG D Hを得ることができる。

【0051】例えば、セファデックス (Sephadex) ゲル (ファルマシアバイオテク) などによるゲルろ過、D E A EセファロースCL-6B (ファルマシアバイオテク)、オクチルセファロースCL-6B (ファルマシアバイオテク) 等のカラムクロマトグラフィーにより分離、精製し、精製酵素標品を得ることができる。該精製酵素標品は、電気泳動 (S D S-P A G E) 的に単一のバンドを示す程度に純化されていることが好ましい。

【0052】上記のようにして得られた精製酵素を、例えば凍結乾燥、真空乾燥やスプレードライなどにより粉

末化して流通させることができる。その際、精製酵素はリン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液やG O O Dの緩衝液に溶解しているものを用いることができる。好適なものはG O O Dの緩衝液であり、なかでも、P I P E S、M E SもしくはM O P S緩衝液が特に好ましい。また、カルシウムイオンまたはその塩、およびグルタミン酸、グルタミン、リジン等のアミノ酸類、さらに血清アルブミン等を添加することによりG D Hをより安定化することができる。

10 【0053】本発明のP Q Qを補欠分子とするG D Hの一例は、以下に示すような理化学的性質を有する。

作用：D-グルコース + 人工電子受容体 → δ-グルコノラクトン+還元型電子受容体

熱安定性：約50℃以下 (p H 7. 5、30分間処理)

p H安定性：3. 5~8. 5 (25℃、16時間処理)

至適温度：約40℃

至適p H：7. 0

分子量：50000

【0054】本発明において、補欠分子族とするG D H活性の測定は以下の条件で行う。

【0055】<試薬>

50 mM P I P E S緩衝液 (p H 6. 5)

0. 2 mM P M S

0. 2 mM N T B

30. 6 mM グルコース

0. 19% トリトンX-100

【0056】<測定条件>上記試薬混液3m lを37℃で約5分予備加温後、0. 1m lの酵素溶液を加え、緩やかに混和後、水を対照に37℃に制御された分光光度計で5分間記録し、その直線部分から1分間あたりの吸光度変化を測定する。盲検は酵素溶液の代わりに蒸留水を試薬混液に加えて、以下同様に吸光度変化を測定する。上記条件で1分間に1/2 μ m o lのジホルマザンを生成する酵素量を1単位 (U) とする。

【0057】

【実施例】以下、実施例により、本発明を具体的に説明する。

実施例1：染色体D N Aの分離

40 アシネットバクター・カルコアセティカスNCIB11517の染色体D N Aを次の方法で分離した。同菌株を100m lのL B培地で30℃、一晩振とう培養した後、遠心分離 (8000 r p m、10分間) により集菌した。20%シーカロース、50 mMトリス/塩酸緩衝液 (p H 7. 6)、1 mM E D T Aを含んだ溶液5m lに懸濁し、1m lのプロティナーゼK溶液 (100 mg/m l)を加えて37℃、30分間保温し、次いで、1m lの10%ラウロイルサルコシンナトリウム溶液を加えた。

【0058】上記溶液に等量のクロロホルム・フェノール溶液 (1:1)を加え、攪拌混合し、10000 r p

m、3分間の遠心で水層と溶媒層に分け、水層を分取した。該水層に2倍量のエタノールを静かに重層し、ガラス棒でゆっくり攪拌しながらDNAをガラス棒に巻き付かせて分離した。これを1mM EDTAを含んだトリス／塩酸緩衝液(pH 8.0；以下、TEと略記する)で溶解した。これを等量のクロロホルム・フェノール溶液で処理後、遠心分離により水層を分取し、2倍量のエタノールを加えて、上記方法で再度DNAを分離し、2mLのTEで溶解した。

【0059】実施例2：PQQを補欠分子族とする可溶性GDHをコードする遺伝子を含有するDNA断片及び該DNA断片を有する組換えベクターの調製

実施例1で得たDNA 5 μgを制限酵素Sau3AI(東洋紡績製)で部分分解し、2kbp以上の断片にした後、BamHI(東洋紡績製)で切断したpBluescript KS(+) 1 μgとT4 DNAリガーゼ(東洋紡績製)1単位で16°C、16時間反応させ、DNAを連結した。連結したDNAはエシェリヒアJM109のコンピテントセル(東洋紡績製)を用いて形質転換した。使用したDNA 1 μg当たり約10⁵個の形質転換体のコロニーが得られた。

【0060】次いで、得られたコロニーは50 μg/mLアンピシリンを含んだLB培地で30°C、24時間培養し、リゾチーム破碎後、PQQを添加し、該粗酵素液の可溶性GDH活性を測定した。その結果、1株のPQQを補欠分子族とするGDH生産株を見出した。該菌株の保有するプラスミドには約8kbの挿入DNAが存在しており、該プラスミドをpPGH1とした。

【0061】該プラスミドDNA 5 μgを制限酵素MboI I(東洋紡績製)で切断してアガロースゲル電気泳動を行ない、可溶性GDH遺伝子を含む長さ約1.9kbの断片を切り出した。単離したDNAとEcoRV(東洋紡績製)で切断したpBluescriptKS(+) 1 μgとをT4 DNAリガーゼ1単位で16°C、16時間反応させ、DNAを連結した。連結したDNAはエシェリヒア・コリJM109のコンピテントセルを用いて形質転換を行った。得られたコロニー中にGDH遺伝子を有するプラスミドを有するコロニーを見出し、該プラスミドをpPGH2と命名した。

【0062】実施例3：塩基配列の決定

pPGH2の挿入DNA断片について常法に従い、デリーションミュータントを調製した。種々のサブクローニングは常法に従い、シーケンシング・キット(Radioactive Sequencing Kit)(東洋紡績製)を用いて塩基配列を決定した。決定した塩基配列およびアミノ酸配列は配列番号1および2に示す通りである。アミノ酸配列から求められる蛋白質の分子量は約52800であり、アシネットバクター・カルコアセティカスNCIB11517のGDHの分子量とほぼ一致した。

【0063】実施例4：アシネットバクター・バウマンニJCM6841の可溶性GDHの塩基配列の決定

アシネットバクター・バウマンニJCM6841の染色体DNAを実施例1と同様の方法で分離し、PQQを補欠分子族とする可溶性GDHをコードする遺伝子を含有するDNA断片及び該DNA断片を有する組換えベクターの調製を実施例2と同様に実施し、約7Kbpの挿入断片を有するpPGH6を取得した。該プラスミドよりGDHをコードする遺伝子を含有するDNA断片を含む4kbのDNA断片を常法により、サブクローニングしてpPGH7を構築した。

【0064】次に、pPGH7の挿入DNA断片について常法に従いデリーションミュータントを調製した。種々のサブクローニングは常法に従い、シーケンシング・キット(Radioactive Sequencing Kit)(東洋紡績製)を用いて塩基配列を決定した。決定した塩基配列およびアミノ酸配列は配列番号3および4に示す通りである。アミノ酸配列から求められる蛋白質の分子量は約53000であり、アシネットバクター・バウマンニJCM6841のGDHの分子量とほぼ一致した。

【0065】実施例5：シードモナス属細菌で複製できる発現ベクターの構築

実施例3で得たプラスミドDNA 5 μgを制限酵素BamHIおよびXhoI(東洋紡績製)で切断して、GDH遺伝子を含む長さ1.9kbの断片を含むDNAを単離した。単離したDNAとBamHIおよびXhoIで切断したpTS1137を1 μgとをT4 DNAリガーゼ1単位で16°C、16時間反応させ、DNAを連結した。連結したDNAはエシェリヒア・コリDH5 α のコンピテントセルを用いて形質転換を行った。得られたコロニー中にGDH遺伝子を有するプラスミドを有するコロニーを見出し、該プラスミドをpGLD3と命名した。

【0066】実施例6：アシネットバクター属細菌で複製できる発現ベクターの構築

実施例3で得たプラスミドDNA 5 μgを制限酵素MboI I(東洋紡績製)で切断して、GDH遺伝子を含む長さ1.9kbの断片を含むDNAを単離した。単離したDNAとMscI(東洋紡績製)で切断したpWH1266を1 μgとをT4 DNAリガーゼ1単位で16°C、16時間反応させ、DNAを連結した。連結したDNAはエシェリヒア・コリDH5 α のコンピテントセルを用いて形質転換を行った。得られたコロニー中にGDH遺伝子を有するプラスミドを有するコロニーを見出し、該プラスミドをpGLD4と命名した。

【0067】比較例1：エシェリヒア・コリ宿主用発現ベクターの構築

実施例3で得たプラスミドDNA 5 μgを制限酵素MboI I(東洋紡績製)で切断して、GDH遺伝子を含む長さ1.8kbの断片を含むDNAを単離した。単離したDNAとEcoRVで切断したpBluescript KS(+) 1 μgとをT4 DNAリガーゼ1単位で16°C、16時間反応させ、DNAを連結した。連結したDNAはエシェリヒア

・コリJM109のコンピテントセルを用いて形質転換を行った。得られたコロニー中にG DH遺伝子を有するプラスミドを有するコロニーを見出し、該プラスミドをpGLD5と命名した。

【0068】比較例2：エシェリヒア・コリJM109/pGLD5からのPQQを補欠分子族とするG DHの製造Terrific broth 500m1を2Lフラスコに分注し、121℃、15分間オートクレーブを行い、放冷後、別途無菌ろ過した50mg/m1アンピシリン0.5m1を添加した。該培地にLB培地で予め、30℃、24時間振とう培養したエシェリヒア・コリJM109/pGGLD5の培養液5m1を接種し、37℃で24時間通気攪拌培養した。培養終了時のG DH活性は約0.34U/m1であった。一方、活性測定試薬に10μmolのPQQを添加後、活性測定すると120U/m1であった。

【0069】実施例7：PQQ生産能を有する微生物の形質転換体の作製

シュードモナス・プチダTE3493（微研寄12298号）をLBG培地（LB培地+0.3%グリセロール）で30℃、16時間培養し、遠心分離（12000rpm、10分間）により菌体を回収し、この菌体に氷冷した300mMシュークロースを含む5mM K-リン酸緩衝液（pH7.0）8m1を加え、菌体を懸濁した。再度遠心分離（12000rpm、10分間）により菌体を回収し、この菌体に氷冷した300mMシュークロースを含む5mM K-リン酸緩衝液（pH7.0）0.4m1を加え、菌体を懸濁した。

【0070】該懸濁液に実施例5で得たプラスミドDNA（pGLD3）0.5μgを加え、エレクトロポーレーション法により形質転換した。50μg/m1ストレプトマイシンを含んだLB培地に生育したコロニーより、PQQを補欠分子族とする可溶性G DH活性を有するクローナーを得た。

【0071】同様に、上記pGLD3を用いて、シュードモナス・プチダTN1126株、シュードモナス・エルギノサPA01162株、シュードモナス・フルオレッセンスIF012568株より形質転換体を取得した。

【0072】また、アシネットバクター・カルコアセティカスNCIB11517をLB培地で30℃、16時間培養し、遠心分離（12000rpm、10分間）により菌体を回収し、この菌体に氷冷した滅菌水8m1を加え、菌体を懸濁した。再度遠心分離（12000rpm、10分間）により菌体を回収し、該菌体に10%グリセロール0.4m1を加え、菌体を懸濁した。

【0073】該懸濁液50μlに実施例6で得たプラスミドDNA（pGLD4）0.5μgを加え、エレクトロポーレーション法により形質転換した。テトラサイクリン50μg/m1を含んだLB培地に生育したコロニーより、PQQを補欠分子族とする可溶性G DH活性を有するクローナーを得た。

【0074】実施例8：得られた形質転換体によるG DH活性発現量の比較

実施例7で得られた5種の形質転換体、比較例2で得られた形質転換体および対照としてアシネットバクター・カルコアセティカスNCIB11517をTerrific broth 50m1（1.2%ポリペプトン、2.4%酵母エキス、0.4%NaCl、17mM KH₂PO₄、72mM K₂HPO₄、pH7.0）で30℃、24時間培養し、遠心分離（12000rpm、3分間）により菌体を回収した。該菌体を1mMのCaCl₂を含んだ50mMトリス/塩酸緩衝液、pH7.5に懸濁後、超音波により菌体を破碎した。遠心分離（12000rpm、5分間）によって菌体残さを除去した、粗酵素液を調製後、G DH活性を測定した。その結果を表1に示す。

【0075】実施例9：シュードモナス・プチダTE3493/pGLD3からのPQQを補欠分子族とするG DHの製造Terrific broth 500m1を2Lフラスコに分注し、121℃、15分間オートクレーブを行い、放冷後、別途無菌ろ過した50mg/m1ストレプトマイシン0.5m1を添加した。該培地にLB培地で予め、30℃、24時間振とう培養した実施例7で得られたシュードモナス・プチダTE3493/pGLD3の培養液5m1を接種し、37℃で48時間通気攪拌培養した。培養終了時のG DH活性は約45U/m1であった。

【0076】上記菌体を遠心分離にて集菌し、20mMリン酸緩衝液、pH7.0に懸濁した。該菌体懸濁液をフレンチプレスで破碎後、遠心分離を行い、上清液を粗酵素液として得た。該粗酵素液をポリエチレンイミンによる除核酸処理および硫安分画処理を行った後、セファデックスG-25（ファルマシアバイオテク）によるゲルろ過により脱塩し、CMセファロース（ファルマシアバイオテク）、フェニルセファロース（ファルマシアバイオテク）カラムクロマトグラフィーにより分離、精製して、精製酵素標品を得た。

【0077】上記の方法により得られたG DH標品は電気泳動（SDS-PAGE）的にほぼ単一のバンドを示し、この際の比活性は約2100U/mgタンパク質であった。

【0078】以下に、上記方法により得られたPQQを補欠分子族とするG DHの性質を示す。

作用：D-グルコース + 人工電子受容体 → δ-グルコノラクトン+還元型電子受容体

熱安定性：約50℃以下（pH7.5, 30分間処理）

pH安定性：3.5~8.5（25℃, 16時間処理）

至適温度：約40℃

至適pH：7.0

分子量：50000

【0079】上記菌体を遠心分離にて集菌し、20mMリン酸緩衝液（pH7.0）に懸濁した。該菌体懸濁液をフレンチプレスで破碎後、遠心分離を行い、上清液を

粗酵素液として得た。該粗酵素液をポリエチレンイミンによる除核酸処理および硫安分画処理を行った後、セファデックスG-25（ファルマシアバイオテク）によるゲルろ過により脱塩し、CMセファロース（ファルマシアバイオテク）、フェニルセファロース（ファルマシアバイオテク）カラムクロマトグラフィーにより分離、精製し、精製酵素標品を得た。

【0080】本方法により得られたG D H標品は電気泳動（SDS-PAGE）的にほぼ単一のバンドを示し、この際の比活性は約85U/mgタンパク質であつた。この酵素を1mMのCaCl₂および10μmol*

形質転換体によるグルコースデヒドロゲナーゼ活性発現量

形質転換体	活性発現量 (U/ml)
P. putida TE3493/pGLD3	43
P. putida TN1126/pGLD3	26
P. aeruginosa PA01162/pGLD3	30
P. fluorescens 1F012568/pGLD3	27
A. calcoaceticus NCIB11517/pGLD4	22
E. coli JM109/pGLD5 (比較例2)	0.23
A. calcoaceticus NCIB11517 (対照)	1.6

培養液1ml当たりの酵素活性

【0083】

※30※【表2】
グルコースデヒドロゲナーゼ粉末の安定性

緩衝液	残存活性 (%)	
	凍結乾燥直後	37°C, 3日間
トリス塩酸, pH 7.5	98.6	38.8
PIPES, pH 6.5	99.8	101.0
MES, pH 6.5	102.0	99.6
MOPS, pH 6.5	99.2	52.4
HEPES, pH 7.0	101.0	28.3

凍結乾燥前のグルコースデヒドロゲナーゼ活性を100とする

【0084】

【発明の効果】上述したように、本発明において、P Qを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼが単離された。また、P Q生産能を有する微生物を用いた

宿主-ベクター系を利用する遺伝子工学技術により、P Qを補欠分子族とするG D Hの製造方法が確立された。本発明の製造方法によれば、高純度なP Qを補欠分子族とするG D Hを安価に効率よく生産することが可

能である。

【0085】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：480

配列の型：アミノ酸

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

起源

生物名：アシネットバクター・カルコアセティカス (Acinetobacter calcoaceticus)

* 株名：NCIB11517

配列

Met	Asn	Lys	His	Leu	Leu	Ala	Ile	Thr	Leu	Leu	Gly	Ala	Ala	Gln	
1				5				10					15		
Leu	Phe	Thr	Phe	His	Thr	Ala	Phe	Ala	Asp	Ile	Pro	Leu	Thr	Pro	Ala
				20				25				30			
Gln	Phe	Ala	Lys	Ala	Lys	Thr	Glu	Asn	Phe	Asp	Lys	Lys	Val	Ile	Leu
				35			40				45				
Ser	Asn	Leu	Asn	Lys	Pro	His	Ala	Leu	Leu	Trp	Gly	Pro	Asp	Asn	Gln
				50			55				60				
Ile	Trp	Leu	Thr	Glu	Arg	Ala	Thr	Gly	Lys	Ile	Leu	Arg	Val	Asn	Pro
				65			70				75			80	
Val	Ser	Gly	Ser	Ala	Lys	Thr	Val	Phe	Gln	Val	Pro	Glu	Ile	Val	Ser
				85			90				95				
Asp	Ala	Asp	Gly	Gln	Asn	Gly	Leu	Leu	Gly	Phe	Ala	Phe	His	Pro	Asp
				100			105				110				
Phe	Lys	His	Asn	Pro	Tyr	Ile	Tyr	Ile	Ser	Gly	Thr	Phe	Lys	Asn	Pro
				115			120				125				
Lys	Ser	Thr	Asp	Lys	Glu	Leu	Pro	Asn	Gln	Thr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr
				130			135				140				
Thr	Tyr	Asn	Lys	Thr	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Lys	Pro	Ile	Asp	Leu	Ile
				145			150				155			160	
Ala	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Lys	Asp	His	Gln	Ser	Gly	Arg	Leu	Val	Ile
				165			170				175				
Gly	Pro	Asp	Gln	Lys	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Ile	Gly	Asp	Gln	Gly	Arg	Asn
				180			185				190				
Gln	Leu	Ala	Tyr	Leu	Phe	Leu	Pro	Asn	Gln	Ala	Gln	His	Thr	Pro	Thr
				195			200				205				
Gln	Gln	Glu	Leu	Asn	Ser	Lys	Asp	Tyr	His	Thr	Tyr	Met	Gly	Lys	Val
				210			215				220				
Leu	Arg	Leu	Asn	Leu	Asp	Gly	Ser	Val	Pro	Lys	Asp	Asn	Pro	Ser	Phe
				225			230				235			240	
Asn	Gly	Val	Val	Ser	His	Ile	Tyr	Thr	Leu	Gly	His	Arg	Asn	Pro	Gln
				245			250				255				
Gly	Leu	Ala	Phe	Ala	Pro	Asn	Gly	Lys	Leu	Leu	Gln	Ser	Glu	Gln	Gly
				260			265				270				
Pro	Asn	Ser	Asp	Asp	Glu	Ile	Asn	Leu	Val	Leu	Lys	Gly	Gly	Asn	Tyr
				275			280				285				
Gly	Trp	Pro	Asn	Val	Ala	Gly	Tyr	Lys	Asp	Asp	Ser	Gly	Tyr	Ala	Tyr
				290			295				300				
Ala	Asn	Tyr	Ser	Ala	Ala	Thr	Asn	Lys	Ser	Gln	Ile	Lys	Asp	Leu	Ala
				305			310				315			320	
Gln	Asn	Gly	Ile	Lys	Val	Ala	Thr	Gly	Val	Pro	Val	Thr	Lys	Glu	Ser
				325			330				335				
Glu	Trp	Thr	Gly	Lys	Asn	Phe	Val	Pro	Pro	Leu	Lys	Thr	Leu	Tyr	Thr

(13)

特開平11-243949

23

24

340	345	350	
Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro Thr Cys Gly Glu Met Ala			
355	360	365	
Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser Ser Ala Tyr Val Tyr Thr			
370	375	380	
Gly Gly Lys Lys Ala Ile Pro Gly Trp Glu Asn Thr Leu Leu Val Pro			
385	390	395	400
Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile Lys Leu Asp Pro Thr Tyr			
405	410	415	
Ser Thr Thr Leu Asp Asp Ala Ile Pro Met Phe Lys Ser Asn Asn Arg			
420	425	430	
Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Glu Gly Asn Thr Leu Tyr Val Leu			
435	440	445	
Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp Asp Gly Ser Val Thr His			
450	455	460	
Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys Phe Thr Tyr Asn Gly Lys			
465	470	475	480

【0086】配列番号：2

* 起源

配列の長さ：1443

生物名：アシネトバクター・カルコアセティカス (Acin-

配列の型：核酸

20 etobacter calcoaceticus)

トポロジー：直鎖状

株名：NCIB11517

配列の種類：ゲノムDNA

*

配列

ATG AAT AAA CAT TTA TTA GCA AAA ATC ACT CTT TTA GGT GCT GCA CAA	48
Met Asn Lys His Leu Leu Ala Lys Ile Thr Leu Leu Gly Ala Ala Gln	
1 5 10 15	
CTA TTT ACC TTT CAT ACC GCA TTT GCA GAT ATA CCT CTG ACA CCT GCT	96
Leu Phe Thr Phe His Thr Ala Phe Ala Asp Ile Pro Leu Thr Pro Ala	
20 25 30	
CAG TTC GCA AAA GCG AAA ACA GAA AAT TTT GAT AAA AAA GTG ATT CTG	144
Gln Phe Ala Lys Ala Lys Thr Glu Asn Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu	
35 40 45	
TCC AAT TTA AAT AAA CCA CAT GCT TTG TTA TGG GGG CCA GAT AAT CAA	192
Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln	
50 55 60	
ATT TGG TTA ACC GAA CGT GCA ACT GGC AAA ATT TTA AGA GTC AAT CCT	240
Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro	
65 70 75 80	
GTA TCT GGT AGC GCG AAA ACA GCA TTT CAG GTT CCT GAA ATT GTG AGT	288
Val Ser Gly Ser Ala Lys Thr Val Phe Gln Val Pro Glu Ile Val Ser	
85 90 95	
GAT GCT GAT GGG CAA AAT GGT TTG TTA GGT TTT GCT TTT CAT CCT GAC	336
Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu Gly Phe Ala Phe His Pro Asp	
100 105 110	
TTT AAA CAT AAC CCT TAT ATC TAT ATT TCA GGC ACT TTT AAA AAT CCA	384
Phe Lys His Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro	
115 120 125	
AAA TCT ACA GAT AAA GAG TTA CCT AAT CAG ACG ATT ATT CGT AGA TAT	432
Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr	
130 135 140	

(14)

特開平1 1-2 4 3 9 4 9

25

26

ACC TAT AAT AAA ACT ACA GAT ACA TTT GAA AAG CCT ATT GAT TTG ATT 480
 Thr Tyr Asn Lys Thr Thr Asp Thr Phe Glu Lys Pro Ile Asp Leu Ile
 145 150 155 160
 GCA GGT TTA CCG TCA TCA AAA GAT CAT CAG TCT GGT CGT CTC GTT ATT 528
 Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile
 165 170 175
 GGT CCA GAC CAA AAA ATC TAC TAT ACG ATT GGT GAC CAA GGT CGT AAT 576
 Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn
 180 185 190
 CAG TTA GCT TAT CTG TTC TTA CCG AAT CAG GCA CAG CAT ACT CCG ACT 624
 Gln Leu Ala Tyr Leu Pro Asn Gln Ala Gln His Thr Pro Thr
 195 200 205
 CAG CAA GAG CTC AAT AGT AAA GAC TAC CAT ACA TAT ATG GGT AAA GTA 672
 Gln Gln Glu Leu Asn Ser Lys Asp Tyr His Thr Tyr Met Gly Lys Val
 210 215 220
 TTA CCC TTA AAT CTG GAC GGC AGT GTA CCT AAA GAC AAC CCA AGC TTT 720
 Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Val Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe
 225 230 235 240
 AAC GGC GTA GTG AGT CAT ATC TAC ACT TTA CGG CAC CGT AAT CCA CAA 768
 Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr Leu Gly His Arg Asn Pro Gln
 245 250 255
 GGT TTA GCA TTT GCC CCA AAT GGA AAG CTT TTA CAA TCT GAG CAA GGA 816
 Gly Leu Ala Phe Ala Pro Asn Gly Lys Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly
 260 265 270
 CCA AAT TCT GAT GAA ATT AAC CTT GTA TTA AAA GGT GGT AAC TAT 864
 Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu Val Leu Lys Gly Gly Asn Tyr
 275 280 285
 GGC TGG CCA AAT GTA GCT GGT TAT AAA GAT GAC AGT GGT TAT GCC TAT 912
 Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr
 290 295 300
 GCA AAC TAT TCG GCA GCA ACC AAT AAA TCA CAA ATT AAA GAT TTA CCT 960
 Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Thr Asn Lys Ser Gln Ile Lys Asp Leu Ala
 305 310 315 320
 CAA AAC GGG ATA AAA GTA GCA ACA GGT GTT CCT GTG ACT AAA GAG TCT 1008
 Gln Asn Gly Ile Lys Val Ala Thr Gly Val Pro Val Thr Lys Glu Ser
 325 330 335
 GAA TGG ACT GGT AAA AAC TTT GTG CCG CCT TTG AAA ACT TTA TAT ACG 1056
 Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro Leu Lys Thr Leu Tyr Thr
 340 345 350
 GTA CAA GAT ACC TAT AAC TAT AAT GAC CCT ACT TGT GGT GAG ATG GCA 1104
 Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro Thr Cys Gly Glu Met Ala
 355 360 365
 TAT ATT TGC TGG CCA ACG GTT GCA CCG TCA TCA GCA TAT GTA TAT ACG 1152
 Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser Ser Ala Tyr Val Tyr Thr
 370 375 380
 GGA GGC AAA AAA GCG ATT CCA GGG TGG GAA AAT ACA TTA TTG GTC CCA 1200
 Gly Gly Lys Lys Ala Ile Pro Gly Trp Glu Asn Thr Leu Leu Val Pro
 385 390 395 400
 TCT TTA AAA CGT CGG GTG ATT TTC CGT ATT AAA TTG GAC CCG ACA TAT 1248
 Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile Lys Leu Asp Pro Thr Tyr

405	410	415
AGC ACG ACT TTG GAT GAT GCT ATC CCA ATG TTT AAA ACC AAT AAC CGT 1296		
Ser Thr Thr Leu Asp Asp Ala Ile Pro Met Phe Lys Ser Asn Asn Arg		
420	425	430
TAT CGT GAT GTC ATC GCT AGT CCA GAA GGT AAT ACC TTA TAT GTC CTG 1344		
Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Glu Gly Asn Thr Leu Tyr Val Leu		
435	440	445
ACT GAT ACA GCG GGG AAT GTA CAA AAA GAT GAT GGT TCT GTC ACT CAT 1392		
Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp Asp Gly Ser Val Thr His		
450	455	460
ACT TTA GAG AAT CCC GGT TCT CTC ATT AAA TTT ACA TAT AAC GGT AAG 1440		
Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys Phe Thr Tyr Asn Gly Lys		
465	470	475
480		
TAA		
1443		

【0087】配列番号：3

配列の長さ：480

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

* 起源

生物名：アシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*)

株名：JCM6841

*

配列

Met	Asn	Lys	His	Leu	Leu	Ala	Lys	Ile	Thr	Leu	Leu	Gly	Ala	Ala	Gln
1				5				10						15	
Leu	Phe	Thr	Phe	His	Thr	Ala	Phe	Ala	Asp	Ile	Pro	Leu	Thr	Pro	Ala
				20				25						30	
Gln	Phe	Ala	Lys	Ala	Lys	Thr	Glu	Asn	Phe	Asp	Lys	Lys	Val	Ile	Leu
				35				40						45	
Ser	Asn	Leu	Asn	Lys	Pro	His	Ala	Leu	Leu	Trp	Gly	Pro	Asp	Asn	Gln
				50				55						60	
Ile	Trp	Leu	Thr	Glu	Arg	Ala	Thr	Gly	Lys	Ile	Leu	Arg	Val	Asn	Pro
				65				70						80	
Val	Ser	Gly	Ser	Ala	Lys	Thr	Val	Phe	Gln	Val	Pro	Glu	Ile	Val	Ser
				85				90						95	
Asp	Ala	Asp	Gly	Gln	Asn	Gly	Leu	Leu	Gly	Phe	Ala	Phe	His	Pro	Asp
				100				105						110	
Phe	Lys	His	Asn	Pro	Tyr	Ile	Tyr	Ile	Ser	Gly	Thr	Phe	Lys	Asn	Pro
				115				120						125	
Lys	Ser	Thr	Asp	Lys	Glu	Leu	Pro	Asn	Gln	Thr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr
				130				135						140	
Thr	Tyr	Asn	Lys	Thr	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Lys	Pro	Ile	Asp	Leu	Ile
				145				150						160	
Ala	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Lys	Asp	His	Gln	Ser	Gly	Arg	Leu	Val	Ile
				165				170						175	
Gly	Pro	Asp	Gln	Lys	Ile	Tyr	Tyr	Ile	Gly	Asp	Gln	Gly	Arg	Asn	
				180				185						190	
Gln	Leu	Ala	Tyr	Leu	Phe	Leu	Ser	Asn	Gln	Ala	Gln	His	Thr	Pro	Thr
				195				200						205	
Gln	Gln	Glu	Leu	Asn	Ser	Lys	Asp	Tyr	His	Thr	Tyr	Met	Gly	Lys	Val
				210				215						220	
Leu	Arg	Leu	Asn	Leu	Asp	Gly	Ser	Ile	Pro	Lys	Asp	Asn	Pro	Ser	Phe
				225				230						240	

29

30

Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr Leu Gly His Arg Asn Pro Gln
 245 250 255
 Gly Leu Ala Phe Ala Pro Asn Gly Lys Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly
 260 265 270
 Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu Val Leu Lys Gly Gly Asn Tyr
 275 280 285
 Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr
 290 295 300
 Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Thr Asn Lys Ser Gln Ile Lys Asp Leu Ala
 305 310 315 320
 Gln Asn Gly Ile Lys Val Ala Thr Gly Val Pro Val Thr Lys Glu Ser
 325 330 335
 Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro Leu Lys Thr Leu Tyr Thr
 340 345 350
 Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro Thr Cys Gly Glu Met Ala
 355 360 365
 Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser Ser Ala Tyr Val Tyr Thr
 370 375 380
 Gly Gly Lys Lys Ala Ile Pro Gly Trp Glu Asn Thr Leu Leu Val Pro
 385 390 395 400
 Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile Lys Leu Asp Pro Thr Tyr
 405 410 415
 Ser Thr Thr Leu Asp Asp Ala Ile Pro Met Phe Lys Ser Asn Asn Arg
 420 425 430
 Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Glu Gly Asn Thr Leu Tyr Val Leu
 435 440 445
 Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp Asp Gly Ser Val Thr His
 450 455 460
 Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys Phe Thr Tyr Asn Gly Lys
 465 470 475 480

【0088】配列番号：4

* 起源

配列の長さ：1443

生物名：アシネトバクター・バウマンニ (Acinetobacter baumannii)

配列の型：核酸

株名：JCM6841

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ゲノムDNA

*

配列

ATG AAT AAA CAT TTA TTA GCA AAA ATC ACT CTT TTA GGT GCT GCA CAA 48
 Met Asn Lys His Leu Leu Ala Lys Ile Thr Leu Leu Gly Ala Ala Gln
 1 5 10 15
 CTA TTT ACG TTT CAT ACG GCA TTT GCA GAT ATA CCT CTG ACA CCT GCT 96
 Leu Phe Thr Phe His Thr Ala Phe Ala Asp Ile Pro Leu Thr Pro Ala
 20 25 30
 CAG TTC GCA AAA GCG AAA ACA GAA AAT TTT GAT AAA AAA GTG ATT CTG 144
 Gln Phe Ala Lys Ala Lys Thr Glu Asn Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu
 35 40 45
 TCC AAT TTA AAT AAA CCA CAT GCT TTG TTA TGG GGG CCA GAT AAT CAA 192
 Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln
 50 55 60
 ATT TGG TTA ACC GAA CGT GCA ACT GGC AAA ATT TTA AGA GTA AAT CCT 240
 Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro

31	32		
65	70	75	80
GTA TCT GGT AGC GCG AAA ACA GTA TTT CAG GTT CCT GAA ATT GTG ACT 288			
Val Ser Gly Ser Ala Lys Thr Val Phe Gln Val Pro Glu Ile Val Ser			
85	90	95	
GAT GCT GAT CGG CAA AAT GGT TTG TTA GGT TTT GCT TTT CAT CCT GAC 336			
Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu Gly Phe Ala Phe His Pro Asp			
100	105	110	
TTT AAA CAT AAC CCT TAT ATC TAT ATT TCA GGC ACT TTT AAA AAT CCA 384			
Phe Lys His Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro			
115	120	125	
AAA TCT ACA GAT AAA GAG TTA CCT AAT CAG ACA ATT ATT CGT AGA TAT 432			
Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr			
130	135	140	
ACC TAT AAT AAA ACT ACA GAT ACA TTT GAA AAG CCT ATT GAT TTG ATT 480			
Thr Tyr Asn Lys Thr Asp Thr Phe Glu Lys Pro Ile Asp Leu Ile			
145	150	155	160
GCA GGT TTA CCG TCA TCA AAA GAT CAT CAG TCT GGT CGT CTC GTT ATT 528			
Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile			
165	170	175	
GGT CCA GAC CAA AAA ATC TAC TAT ACG ATT GGT GAC CAA GGT CGT AAT 576			
Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn			
180	185	190	
CAG TTA GCT TAT CTA TTC TTA TCG AAT CAG GCA CAG CAT ACT CCG ACT 624			
Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Ser Asn Gln Ala Gln His Thr Pro Thr			
195	200	205	
CAG CAA GAG CTC AAT ACT AAA GAC TAC CAT ACA TAT ATG GGT AAA GTA 672			
Gln Gln Glu Leu Asn Ser Lys Asp Tyr His Thr Tyr Met Gly Lys Val			
210	215	220	
TTA CGC TTA AAT CTG GAC GGC ACT ATA CCT AAA GAC AAC CCA AGC TTT 720			
Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe			
225	230	235	240
AAC GGC GTA GTG ACT CAT ATC TAC ACT TTA GGG CAC CGT AAT CCA CAA 768			
Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr Leu Gly His Arg Asn Pro Gln			
245	250	255	
GGT TTA GCA TTT GCC CCA AAT GGA AAG CTT TTA CAA TCT GAG CAA GGG 816			
Gly Leu Ala Phe Ala Pro Asn Gln Lys Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly			
260	265	270	
CCA AAT TCT GAT GAT GAA ATT AAC CTT GTA TTA AAA CGT GGT AAC TAT 864			
Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu Val Leu Lys Gly Gly Asn Tyr			
275	280	285	
GGC TGG CCA AAT GTA GCT GGT TAT AAA GAT GAC ACT GGT TAT GCC TAT 912			
Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr			
290	295	300	
GCA AAC TAT TCG GCA GCA ACC AAT AAA TCA CAA ATT AAA GAT TTA GCT 960			
Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Thr Asn Lys Ser Gln Ile Lys Asp Leu Ala			
305	310	315	320
CAA AAC GGG ATA AAA GTA GCA ACA GGT GTT CCT GTG ACT AAA GAG TCT 1008			
Gln Asn Gly Ile Lys Val Ala Thr Gly Val Pro Val Thr Lys Glu Ser			
325	330	335	
CAA TCG ACT GGT AAA AAC TTT GTG CCA CCT TTG AAA ACT TTA TAT ACG 1056			

33

34

Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro Leu Lys Thr Leu Tyr Thr
 340 345 350
 GTA CAA GAT ACC TAT AAC TAT AAT GAC CCT ACT TGT GGT GAG ATG GCA 1104
 Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro Thr Cys Gly Glu Met Ala
 355 360 365
 TAT ATT TGC TGG CCA ACG GTT GCA CCG TCA TCG GCA TAT GCA TAT ACG 1152
 Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser Ser Ala Tyr Val Tyr Thr
 370 375 380
 GGA GCC AAA AAA GCG ATT CCA GGG TGG GAA AAT ACA TTA TTG GTC CCA 1200
 Gly Gly Lys Ala Ile Pro Gly Trp Glu Asn Thr Leu Leu Val Pro
 385 390 395 400
 TCT TTA AAA CGT GGG GTG ATT TTC CGT ATT AAA TTG GAC CCG ACA TAT 1248
 Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile Lys Leu Asp Pro Thr Tyr
 405 410 415
 AGC ACG ACT TTG GAT GAT GCT ATC CCA ATG TTT AAA AGC AAT AAC CGT 1296
 Ser Thr Thr Leu Asp Asp Ala Ile Pro Met Phe Lys Ser Asn Asn Arg
 420 425 430
 TAT CGT GAT GTC ATC GCT AGT CCA GAA GGT AAT ACC TTA TAT GTG CTG 1344
 Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Glu Gly Asn Thr Leu Tyr Val Leu
 435 440 445
 ACT GAT ACA GCG GGA AAT GCA CAA AAA GAT GAT GGT TCA GTC ACT CAT 1392
 Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp Asp Gly Ser Val Thr His
 450 455 460
 ACT TTA GAG AAT CCC GGT TCT CTC ATT AAA TTT ACA TAT AAC GGT AAG 1440
 Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys Phe Thr Tyr Asn Gly Lys
 465 470 475 480
 TAA 1443

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶ 識別記号

C 1 2 R	1:19)	
(C 1 2 N	1/21	
C 1 2 R	1:19)	
(C 1 2 N	15/09	Z N A
C 1 2 R	1:01)	

F I

(72) 発明者 足立 収生
山口県山口市芝崎町2番2-204

(72) 発明者 松下 一信
山口県山口市吉敷2645-27